

Aus dem Institut und Poliklinik für klinische Immunologie
des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg

Vorstand: Professor Dr. med. J. R. Kalden

**Studien über zirkulierende Immunkomplexe
bei Mäusen mit wachsenden
Methylcholanthren-induzierten
Fibrosarkomen**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Erich Platzer
aus Regensburg

Aus dem Institut und Poliklinik für klinische Immunologie
des Universitätskrankenhauses Erlangen - Nürnberg

Vorstand: Professor Dr. med. J. R. Kalden

Studien über zirkulierende Immunkomplexe bei Mäusen mit wachsenden Methylcholanthren-induzierten Fibrosarkomen



Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Erich Platzer
aus Regensburg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Professor Dr. W. Kersten
Referent: Professor Dr. H. Warnatz
Korreferent: Professor Dr. J.R. Kalden
Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.1979

Ich danke Herrn Professor Dr. med. H. Warnatz für die
Themenstellung und Betreuung der Arbeit und
Herrn Professor Dr. med. J.R. Kalden für das Korreferat
zur Arbeit.

Für wertvolle technische Hilfe danke ich Frau H. Leowald,
Herrn E. Rückert, Frl. Rauh, Frl. G. Tiemann und
Herrn Dr. med. Dipl.-Biol. K. Hiemeyer.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Meinen lieben Eltern

und meiner Frau Lydia gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einführung	1
Fragestellung	3
Methodik	4
- Membranrezeptoren der Raji Zellen, Rosettentest	4
- Durchführung des Raji-Zell-Tests	8
- Der Raji-Zell-Test zum Nachweis von zirkulierenden Immunkomplexen, freien Antigenen und Antikörpern	10
- Empfindlichkeit des Raji-Zell-Tests	15
Materialien und Methoden im Hauptversuch	17
Ergebnisse	23
Diskussion	29
Zusammenfassung	36
Literaturverzeichnis	38

Man weiß heute noch relativ wenig über die Rolle der humoralen (= antikörpervermittelten) und zellbedingten Immunität bei Tumorerkrankungen von Mensch und Tier. Das liegt sicher zu einem großen Teil daran, daß zwar schon tumorassozierte Antigene gefunden und ihre chemische Struktur aufgeklärt werden konnte, - wie z.B. das carcino-embryonale Antigen beim Colonkarzinom und das α_1 -Foetoprotein beim Leberzellkarzinom - daß es aber noch nicht gelungen ist, tumorspezifische Antigene (= TSTA = Tumor-Spezifische-Transplantations-Antigene) zu reinigen und chemisch zu analysieren. Wegen des Fehlens definierter Tumorantigene ergeben sich erhebliche Schwierigkeiten, die komplexen Immunmechanismen bei der Abwehr von Tumoren aufzuklären.

Die Existenz von TSTA bei einer großen Zahl von virus- bzw. chemisch induzierten Tumoren wurde ganz offensichtlich durch Transplantationsversuche bei Tierstämmen, die über lange Zeit ingezüchtet wurden, bis sie schließlich bis auf den Unterschied zwischen den beiden Geschlechtern genetisch völlig identisch, d.h. syngen waren. Hauttransplantate von syngen Tieren führen nicht zu Abstoßungsreaktionen (und auch nicht zu graft-versus-host Reaktionen, d.h. zur Erkrankung des Wirtstieres infolge Proliferation immunkompetenter Spenderzellen aus dem Transplantat). Dagegen ergibt die Übertragung vieler verschiedener Tumoren in syngen Systemen spezifische Immunantworten, die allerdings nicht immer zur Abstoßung des Tumors oder zu einer Verlangsamung, sondern unter Umständen sogar zu einer Beschleunigung (enhancement) des Tumorwachstums führen können. In ver-

schiedenen Versuchen konnte ferner die Bildung tumorspezifischer Antikörper nachgewiesen werden.

In vitro zeigen in vielen Systemen Lymphozyten tumortragender Tiere eine spezifische zytotoxische Aktivität gegen die Tumorzellen. Dabei stellte sich interessanterweise heraus, daß - vielleicht eine Parallele zur in vivo-Beobachtung des enhancements - die Seren tumortragender Tiere die Lymphozytotoxizität gegen Tumorzellen spezifisch zu hemmen vermögen. Dieses Phänomen gab den Anstoß zu einer ganzen Reihe von Untersuchungen. Wie Baldwin und Robins ¹⁾ in einer jüngeren Arbeit zusammenfaßten, sind die spezifisch hemmenden Faktoren in den Tumorträgerseren sehr wahrscheinlich zirkulierende freie Tumorantigene oder freie Tumor-Antikörper und/oder zirkulierende lösliche Komplexe aus beidem (= Immunkomplexe).

Man kann nun bei den hemmenden Faktoren zwei Gruppen unterscheiden: blockierende und inhibierende Faktoren.

Blockierende Faktoren hemmen die Lymphozytotoxizität in vitro, indem sie mit den Tumorzellen reagieren. Wahrscheinlich sind zirkulierende Antikörper gegen Tumorantigene und Immunkomplexe die blockierenden Faktoren. Als Wirkungsmechanismus vermutet man, daß die Antikörper, frei oder in Immunkomplexen enthalten, mit den TSTA an der Oberfläche der Tumorzellmembran reagieren und sie "maskieren"; dadurch könnten die antigen-erkennenden Lymphozyten nicht mehr an die Tumorantigene heran und die Reaktion bliebe aus.

Inhibierende Faktoren dagegen wirken dadurch hemmend, daß sie mit den Lymphozyten reagieren. Die inhibierenden Faktoren in den Seren der Tumorträger sind wahrscheinlich

zirkulierende freie Tumorantigene und Immunkomplexe. Man nimmt dabei an, daß die Lymphozyten, die die spezifische Zytotoxizität für Tumorzellen bewirken, an ihrer Oberfläche Antigenrezeptoren tragen, an die sich das Antigen (frei oder in Komplexen) bindet; dadurch würde wiederum der Kontakt zwischen Lymphozyt und Tumorzelle verhindert, mit entsprechenden Folgen.

Zu diesem Problemkreis laufen im Hause ^{*)} Studien über Lymphozytotoxizität bei methylcholanthren-induzierten Fibrosarkomen (= MCAF) bei Mäusen. Auch in dem hier verwendeten System zeigten sich spezifisch hemmende Faktoren in den Seren tumortragender Tiere.

Im Zusammenhang mit diesem Befund ergaben sich nun für die vorliegende Arbeit folgende Fragestellungen:

- Enthalten die Seren von Mäusen mit wachsenden MCAF zirkulierende Immunkomplexe, freies Tumorantigen oder freie Antikörper?
- Enthalten die Seren von Mäusen, die vor Transplantation der MCAF gegen diese sensibilisiert wurden, nach der Transplantation zirkulierende Immunkomplexe?

*) Institut für klinische Immunologie der Universität
Erlangen-Nürnberg

Zur Methodik

Eine sehr empfindliche Methode zum Nachweis von im Serum zirkulierenden löslichen Immunkomplexen bietet der Raji-Zell-Test nach Theofilopoulos et al. ²⁾, der im folgenden so modifiziert wurde, daß damit auch zirkulierendes freies Tumorantigen und freie Antikörper gegen Tumorantigene sehr empfindlich nachgewiesen werden konnten.

Allgemeines zum Raji-Zell-Test.

Dieser Test beruht darauf, daß Raji-Zellen (eine etablierte Zelllinie menschlicher Lymphoblasten der B-Zell-Reihe) an ihrer Oberflächenmembran Rezeptoren für den Complement-Faktor C 3 (auch für Mäuse-C3) tragen. Im Serum vorhandene Immunkomplexe, die C 3 enthalten, werden an diese Rezeptoren gebunden und dann mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Ferner tragen Raji-Zellen an ihrer Oberfläche zwar Rezeptoren für die F_c -Stücke von menschlichem IgG, nicht aber für die von Mäuse-IgG; daher wird der Nachweis von Immunkomplexen durch Fluoreszenz-Antiserum gegen Maus-7S-Ig nicht gestört durch Bindung von Maus-IgG an Raji-Zellen.

Zum Nachweis der Rezeptoren auf der Membranoberfläche wurden die Raji-Zellen in einem ersten Vortest auf ihre Fähigkeit hin untersucht, EAC-Rosetten ^{*)} zu bilden (nach einer modifizierten Methode nach Bianco et al. ³⁾):

Maus-anti-Hammelerythrozyten-Serum wurde gewonnen von hochimmunisierten BalbC-Mäusen durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus, 2 h Gerinnung bei 20° C und 15 min Abzentrifu-

*) siehe nächste Seite

gieren bei 1700 g und 4° C; das Serum wurde dann hitzeinaktiviert **) (56° C, 30 ') und bei -70° C eingefroren. Dieses Antiserum agglutinierte Hammelerythrozyten bis zu einer Verdünnung von 1:160. Mäusenormalserum, gewonnen nach der gleichen Methode, aber nicht hitzeinaktiviert, und Kaninchennormalserum, immunabsorbiert mit Hammelerythrozyten (20° C, 1 h) wurden beide sowohl als Kontrollen als auch als Komplementquelle verwendet.

Hammelerythrozyten wurden mit einer gerade nicht mehr agglutinierenden Verdünnung des Antiserums als Ambozeptorquelle bzw. mit den hitzeinaktivierten Normalseren inkubiert (37° C, 30 min), gewaschen, und dann ein Teil mit verschiedenen Verdünnungen der Komplementquellen weiterinkubiert (37° C, 30 min) (= EAC bzw. E), ein anderer Teil diente als Kontrollen ohne Complement (= EA bzw. E). Der Rosetten-test mit den so vorbereiteten Hammelerythrozyten und den Raji-Zellen erfolgte bei 37° C 30 min und bei 4° C 1 h.

*) EAC = (Hammel-) Erythrozyt-Ambozeptor-Complement

EA = (Hammel-) Erythrozyt-Ambozeptor

E = (Hammel-) Erythrozyt

Ambozeptor bedeutet hier: ein Antikörper, der gegen Hammelerythrozyten gerichtet ist, dessen antigen-binding-site also an die Ery-Oberfläche gebunden wird, während das F_C-Stück vom Ery weggerichtet ist; das F_C-Stück kann also noch mit F_C-Rezeptoren auf Zellen (z.B. auf Makrophagen) reagieren bzw. Complement aktivieren und dann an Complement-Rezeptoren z.B. auf B-Lymphozyten gebunden werden. Somit kann ein Ambozeptor also zwei verschiedene Zellen aneinander binden; allerdings wird dazu je nach Immunglobulinklasse (IgM oder IgG) eine unterschiedliche Anzahl von Antikörpern benötigt.

**) Diese Hitzeinkubation bei 56° C, 30 min zerstört die normale biologische Funktionsfähigkeit von C1q, der zuerst aktivierten Komponente in der Complement-Kaskade; damit wird das Complementsystem inaktiviert. Außerdem werden die IgM Antikörper inaktiviert, während IgG intakt bleibt.

Tabelle 1

Rosettenbildung von Raji-Zellen mit EAC, EA und E

Hammelerythrozyten (E)

inkubiert mit:

1. Inkubation	2. Inkubation (C-Quelle)	Reaktions- produkt	Prozentsatz der rosettenbildenden *) Raji-Zellen
Maus-anti-E-Serum (= Ambozeptor)	_____	EA	0
	Maus-NS(+) (1:5)	EAC	94
	Kaninchen-NS (+) (1:15)	EAC	85
Maus-NS (+) (hitzeinaktiviert)	_____	E	0
	Maus-NS(+)	E (C)	0
	Kaninchen-NS (+) (1:15)	E (C)	0
	Maus-NS(++)(1:5)	((EAC))	6
_____	_____	E	0

*) Raji-Zellen mit drei und mehr E
 (+) immunabsorbiert mit E
 (++) nicht immunabsorbiert mit E
 NS = Normalserum

Zusammenfassung der Ergebnisse (siehe Tab. 1):

Nahezu alle Raji-Zellen bildeten EAC-Rosetten aber keine EA-Rosetten (mit Ambozeptor von der Maus!) oder E-Rosetten.

Damit sind also Mäuse-Complement-Rezeptoren, aber keine Rezeptoren für F_C -Stücke von Mäuse-IgG auf den Raji-Zellen nachgewiesen. Das stimmt auch mit den Angaben von Theofilopoulos in ²⁾ überein, der zwar eine Species-Spezifität der IgG F_C -Rezeptoren (für menschliches IgG), aber nicht der Complementrezeptoren fand. Daher war offensichtlich zu erwarten, daß man bei Anwendung des Raji-Zell-Tests auf Mäuseserum die IgG F_C -Rezeptoren nicht zu blockieren braucht; denn der Nachweis von Immunkomplexen wird auch so nicht durch die Bindung von "monomerem" IgG gestört.

Somit konnte man nun an die Ausarbeitung und Erprobung des Raji-Zell-Tests nach Theofilopoulos gehen.

Die Durchführung des Raji-Zell-Tests.

Raji-Zellen (kultiviert in Medium RPMI 1640 mit 10 % fetalem Kälberserum und Penicillin/Streptomycin) werden 3-mal in Puffer (Hanks-Lösung ohne Glyzerin) bei 20°C 10 min gewaschen, und je 5×10^7 lebende Zellen (Trypanblau-Exklusion ^{*)}) in 1 ml Hanks-Lösung suspendiert.

Dann werden je 50 µl der zu testenden Proben von Mäuseseren und Kontrollen mit 5×10^6 lebenden Zellen (= 100 µl Zellsuspension) bei 37°C 30 min geschaukelt und anschließend die Zellen wieder 3-mal in Hanks gewaschen (200 µl, 5 min) und bei 4°C 30 min mit einer geeigneten Verdünnung von fluoreszenz-markiertem Antiserum in PBS ^{**)} inkubiert. Zum Nachweis IgG-haltiger Immunkomplexe wurde ein FITC-konjugiertes ^{***)} Anti Maus-7S-Ig Serum von der Ziege verwendet (Fa. Meloy). Nach der gleichen Methode können die Raji-Zellen auch IgM-haltige Komplexe anzeigen mittels eines FITC-konjugierten Antiserums gegen Maus-IgM von der Ziege (ebenfalls Fa. Meloy).

Soweit im folgenden nicht ausdrücklich anders angegeben, wurde immer auf IgG-haltige Immunkomplexe untersucht.

Nach der Inkubation mit dem Fluoreszenz-Antiserum und weiterem 3-maligem Waschen (200 µl, 5 min, 4°C) in PBS wurden die Zellen auf Objektträger getropft, mit Deckglas bedeckt

*) Gleiche Volumina einer 0,5%-igen Trypanblaulösung in physiologischer NaCl-Lösung und der Zellsuspension werden gemischt und in einer Zählkammer unter dem Mikroskop der Prozentsatz der toten Zellen ausgezählt (normalerweise waren das weniger als 10 %). Lebende Zellen haben eine intakte Zellmembran und lassen den Farbstoff nicht in Cytoplasma und Kern eindringen. Tote Zellen dagegen färben sich ganz blau.

**) PBS = Phosphate Buffered Saline.

***) FITC = Fluoroisothiocyanat, ergibt grüngelbe Fluoreszenz bei UV-Beleuchtung.

und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Bewertung der Fluoreszenzstärke erfolgte in der Skala

negativ	Ø
schwach positiv	+
mäßig positiv	++
stark positiv	+++

entsprechend der Helligkeit der Fluoreszenz im Vergleich mit bekannten Kontrollen. Lag ein schwach positives (= "+") Ergebnis nahe der unteren Grenze eines noch deutlichen Nachweises, wurde zusätzlich die Notation

sehr schwach positiv (+)

eingeführt.

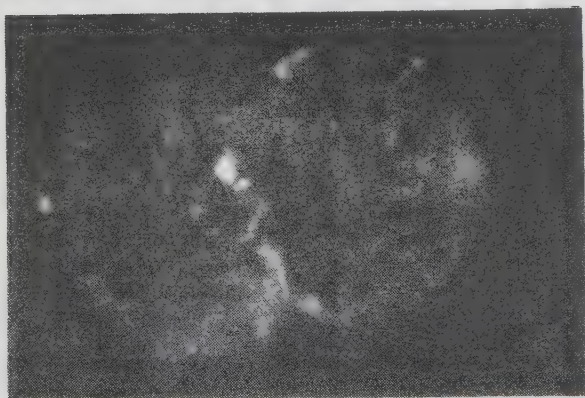


Abb. 1: Das Fluoreszenzmuster von Immunkomplexen auf Raji-Zellen
(Vergrößerung 320-fach; Fluoreszenzstärke +++)

Der Raji-Zell-Test zum Nachweis von zirkulierenden Immunkomplexen, freien Antigenen und Antikörpern.

Um den Raji-Test zu erproben und um die Möglichkeit des Nachweises von zirkulierendem freien Antigen und Antikörper zu prüfen, wurde ein weiterer Vorversuch wie folgt unternommen:

Materialien und Methoden. Je 10 zwei bis drei Monate alte BalbC-Mäuse wurden durch je 4 intraperitoneale (i.p.) Injektionen von je 16 mg humanem Gammaglobulin (HG) ^{*)} bzw. je 20 mg Rinderserumalbumin (BSA) innerhalb von zwei Wochen immunisiert. Ca. vier Wochen später erfolgte eine weitere i.p. Injektion von jeweils der gleichen Menge des betreffenden Antigens. Am 1. und 6. Tag danach wurden jeweils 3 bis 4 Mäusen der BSA-Gruppe, am 1., 3. und 10. Tag je 3 Mäusen der HG-Gruppe durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus Blut entnommen, die Seren der einzelnen Gruppen jeweils gepoolt, und nach 2 h Gerinnung bei 20° C zur Serumgewinnung abzentrifugiert (10 min bei 1700 g und 4° C). Die Seren wurden bei 4° C aufbewahrt und am nächsten Tag verwendet.

Zum Nachweis von zirkulierenden Immunkomplexen wurden Serumproben wie oben beschrieben mit dem Raji-Zell-Test untersucht. Wie Tabelle 2 zeigt, ergab dies im Falle der gegen HG sensibilisierten Mäuse am 1. und 3. Tag eine schwach positive (= +) Fluoreszenz, am 10. Tag ein negatives Ergebnis; im Falle der gegen BSA sensibilisierten Mäuse am 1. Tag ein negatives Ergebnis, am 6. Tag war der Raji-Test schwach

*) Ein handelsübliches Präparat zur Injektionsbehandlung beim Menschen.

positiv (= +). Die Kontrollen von Mäusenormalseren waren negativ.

Zum Nachweis zirkulierender freier (IgG) Antikörper gegen die zur Sensibilisierung verwendeten Antigene wurden die Seren zuerst mit dem betreffenden Antigen (100 µl Serum + + 50 µl 16%-ige bzw. 20%-ige (s.o.) Antigenlösung) bei 37° C 30 min vorinkubiert und dann erst je 50 µl Probe davon dem Raji-Test unterzogen. Bei den gegen HG sensibilisierten Mäusen ergab sich so am 1. Tag ebenfalls eine schwach positive (= +) Fluoreszenz, am 3. und 10. Tag aber ein Anstieg auf ++ bis +++ positiv; bei der Gruppe mit BSA als Antigen war ebenfalls anfangs ein schwach positives, am 6. Tag ein stark positives +++ Ergebnis (siehe Tabelle 2).

Umgekehrt kann man immunkomplexfreie Antiseren mit hohem Antikörpergehalt (z.B. das Antiserum gegen HG vom 10. Tag nach der letzten Antigeninjektion) auch zum Nachweis von freiem Antigen im Serum benützen. So wurden Serumproben von Mäusen vom 1. Tag nach Antigeninjektion (HG) mit einem Antiserum gegen HG inkubiert (50 µl Testserum + 20 µl Antiserum). Der Raji-Test war in diesem Falle ++ positiv (siehe Tabelle 2). Ferner wurde auf diese Weise Antigen (HG) in Verdünnungsreihen nachgewiesen (siehe unten).

Somit gelingt es also, auf dem Umweg über in vitro-Bildung von Immunkomplexen zirkulierende Antikörper bzw. Antigene im Serum nachzuweisen. Allerdings kann man wirklich freie, d.h. nicht in Immunkomplexen vorliegende Antikörper und freie Antigene im Serum nur dann spezifisch nachweisen, wenn das Serum selbst noch keine Immunkomplexe enthält.

Tabelle 2

Zirkulierende Immunkomplexe und freie Antikörper bzw. Antigene im Serum von Mäusen nach Sensibilisierung gegen zwei xenogene Proteine.

Protein-Antigen	Tag nach der letzten Ag-Injektion	Ergebnisse des Raji-Zell-Tests		
		Immunkom- plexe	freie Antikörper (IgG)	freies Antigen
Rinder- serum- albumin (BSA)	1.	Ø	+	-
	6.	+	+++ *)	-
	14.	Ø	+++	Ø
Menschliches Gamma- globulin (HG)	1.	+	+	++ *)
	3.	+	++ bis +++ *)	-
	10.	Ø	+++	-
	14.	Ø	+++	Ø
		IgM-haltige Immunkom- plexe	freie IgM Antikörper	
	1.	(+)	+ bis ++ *)	-
	14.	Ø	+ bis ++	-

*) Da zirkulierende Immunkomplexe im Serum vorhanden, kein ganz spezifischer Nachweis von freien Antikörpern bzw. Antigenen.

- = nicht durchgeführt

Etwa vierzehn Tage nach der letzten Antigeninjektion wurden die Versuchstiere völlig entblutet, die anti-HG- und anti-BSA-Seren jeweils gepoolt und z.T. bei -70° C eingefroren. Der Raji-Test konnte darin keine Immunkomplexe mehr nachweisen, aber eine große Menge ("+++") von freien Antikörpern (s. Tab. 2). Diese Antiseren wurden in weiteren Versuchen sowie im Hauptversuch unter Zugabe von Antigen und frischem Normalserum als Complementquelle zur Herstellung von Positivkontrollen verwendet.

In weiteren Vorversuchen wurden Verdünnungsreihen von in vitro gebildeten Immunkomplexen, von Antigen-Verdünnungen mit konstanter Antiserummenge und von Antiserumverdünnungen mit konstanter Antigenmenge angesetzt, um einen Bezug zwischen den Fluoreszenzstärkestufen im Raji-Test, die ja subjektiv nach der Helligkeit der Immunfluoreszenz bewertet werden, und objektiven Parametern zu finden.

Die Verdünnungsreihen wurden, um das Reaktionsmilieu konstant zu erhalten, größtenteils in frisch gewonnenem Mäusenormalserum (= NS) angesetzt; dazu wurden dieselben Antigenpräparate und Antiseren wie im oben beschriebenen Vorversuch verwendet.

- Immunkomplexe wurden zunächst in vitro gebildet in dem Ansatz 50 μ l Anti-HG-Serum + 50 μ l HG (1:10) + 50 μ l NS (37° C, 30 min). Das Reaktionsgemisch wurde dann in NS auf die angegebenen Stufen (Tab. 3) weiterverdünnt und davon dann je 50 μ l Proben getestet.
- Antikörperverdünnungen erfolgten durch Mischen von Anti-HG-Serum mit NS. Dann wurden 40 μ l Anti-HG-Serum-Verdünnung mit 20 μ l HG (1:10) ebenfalls bei 37° C 30 min inkubiert und anschließend getestet.
- Antigenverdünnungen: HG wurde in PBS verdünnt und dann in folgendem Ansatz inkubiert:
20 μ l HG-Verdünnung + 20 μ l NS + 20 μ l Anti-HG-Serum.

Tabelle 3 faßt die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 3

Beziehungen zwischen Fluoreszenzstärke im Raji-Test und relativem Gehalt der Testseren an Immunkomplexen bzw. Antikörpern oder Antigenen.

=====			
Verdünnungen von	Verdünnungsstufe	Konzentration (µg/100µl Ansatz)	Fluoreszenzstufe im Raji-Test
<u>Antigen:</u> (HG)	1:1	5333,3	+++
	1:10	533,3	+++
	1:100	53,3	++
	1:1000	5,3	+
	1:5000	1,07	(+)
	1:20000	0,27	Ø
<u>Antiserum:</u>	1:1		+++
	1:6		++
	1:10		++
	1:20	*)	+ bis ++
	1:100		+
	1:1000		Ø
<u>Immun-</u> <u>komplexe:</u>	1:1		+++
	1:10		++
	1:100	*)	+
	1:1000		Ø
=====			

*) nicht zu berechnen, da Startmengen unbekannt

Aus Tabelle 3 geht hervor, daß im mittleren Bereich der Fluoreszenzstärkeskala je etwa eine Verdünnungsänderung des Antigens von 1:10 einer Änderung um eine Fluoreszenzstufe entspricht.

Ferner bilden sich insbesondere über einen weiten Bereich von Antigenverdünnungen nachweisbare Mengen von löslichen Immunkomplexen. Daher ist es nicht nötig, mit mehreren Verdünnungsstufen von Antiseren zu arbeiten, um freies Antigen im Serum nachzuweisen. Theofilopoulos gibt dagegen an, daß z.B. für menschliches Serumalbumin (= HSA) und anti-HSA Komplexe nur im Antigenüberschuß nachzuweisen waren, und zwar am stärksten im 2 - 6-fachen Antigenüberschuß, maximal bis zum 30-fachen, darüber nicht mehr ²⁾.

Weiter gibt Tabelle 3 die Empfindlichkeit des Antigen-nachweises im Raji-Test an, wobei man mit der Übertragung auf andere Antigene und Antiseren vorsichtig sein muß, da der Nachweis wahrscheinlich z.T. von Faktoren wie Konzentration und Avidität der Antikörper abhängig ist. Es konnten noch Antigenkonzentrationen von 1,07 µg HG pro 100 µl Probe mit sehr schwach positiven (= (+)), aber noch deutlichen Ergebnissen nachgewiesen werden. Zum Vergleich: Theofilopoulos ²⁾ gab die Empfindlichkeit des Nachweises von menschlichem Serumalbumin (HSA) mittels eines Anti-HSA-Serums vom Kaninchen und Complementreaktion mit etwa 50 ng in 100 µl Kaninchenserum an. Damit erreichte er noch eine um etwa den Faktor 20 bessere Empfindlichkeit des Raji-Zell-Tests beim Antigennachweis.

Aus Tabelle 3 kann man nicht die Nachweisempfindlichkeit für Antikörper oder Immunkomplexe abschätzen, da die absoluten Mengen bei Start der Verdünnungsreihen nicht

bekannt sind. Theofilopoulos erreichte beim Nachweis von aggregiertem Human-Globulin (das sich etwa ähnlich wie Immunkomplexe im Raji-Test verhalten dürfte) nach Complementzugabe eine Empfindlichkeit bis herab zu 20 ng in 100 μ l Serum.

Die vorausgegangenen Untersuchungen zeigen, daß mit dem Raji-Zell-Test eine Methode von großer Empfindlichkeit zur Verfügung steht, mit der man wohl sinnvollerweise an die experimentelle Beantwortung der eingangs aufgeworfenen Fragestellung nach zirkulierenden Immunkomplexen, bzw. freien Tumorantigenen oder Antikörpern gegen Tumorantigene bei Mäusen mit MCAF herangehen kann.

Materialien und Methoden im Hauptversuch

Tiere: Alle in diesem Experiment verwendeten Mäuse waren syngene Mäuse vom Stamm C57-Black, und zwar männliche und weibliche Tiere im Alter von 2 bis 6 Monaten.

Tumor: Es wurde gearbeitet mit einer (Nr. 3) von mehreren Linien von methylcholanthren-induzierten Tumoren (von C57-B1-Mäusen), die im Hause ständig weiter gehalten werden (= MC3).

Zur Überpflanzung dieses Tumors wurden frische Tumoren entnommen, anhängendes Bindegewebe und nekrotisches Gewebe entfernt, mit der Schere zerkleinert, 30 min bei 37⁰ C in 0,25 %-iger Kollagenase geschaukelt, dann die isolierten Zellen in Medium mehrmals gewaschen und je 1×10^6 Tumorzellen in 0,1 ml Medium (RPMI 1640) aufgenommen. Dann wurden je 10^6 so gewonnener Zellen den Mäusen streng subkutan seitlich am Rücken injiziert. Tumoren entwickelten sich bei den nichtimmunisierten Mäusen nach 6 bis 10 Tagen und wuchsen nach 28 Tagen zu einer Größe von etwa 1,5 cm x 1,5 cm x 1,5 cm heran. Diese Tiere erlagen der Tumorerkrankung nach etwa 30 - 40 Tagen.

Als Kontrollzellen wurden frische syngene Fibroblasten nach der gleichen Methode wie oben geschildert aus den Lungen von C57-B1-Mäusen gewonnen und je 10^6 auf Kontrolltiere transplantiert.

Antigengewinnung: Zellfreie Tumorantigen-Präparationen wurden hergestellt mittels 3 m KCl-Extraktion modifiziert nach Meltzer ⁴⁾. Die aus getöteten Mäusen steril entnommenen Tumoren wurden von anhängendem Bindegewebe befreit und nekrotisches Gewebe exzidiert. Dann wurden die

Tumoren mit der Schere zerkleinert und mehrmals in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Tumorantigene wurden extrahiert, indem je 1 g Tumorfeuchtgewicht mit 4 ml einer 3 m KCl-Lösung in 0,005 m Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4 $\pm$ 0,3 bei 4° C 16 bis 24 Stunden lang inkubiert wurden.

Man erwartet dabei folgende Wirkung:

Die 3 m KCl-Lösung extrahiert infolge der auftretenden starken Ionenkräfte Bestandteile aus der Tumorzellmembran, zum Teil Tumorantigene ^{*)}, wobei aber nur nichtkovalente Bindungen gelöst werden. Daher dürften diese extrahierten Tumorantigene relativ wenig alteriert sein im Vergleich zu anderen Methoden der zellfreien Tumorantigenpräparation (wie z.B. exzymatische Methoden, Ultraschall). Da außerdem in der stark hypertonen Lösung die Zellen nicht platzen, wird das antigenhaltige Material kaum von Stoffen aus dem Zellinneren verunreinigt.

Das Reaktionsgemisch wurde dann 1 Stunde bei 40.000 g und 4° C zentrifugiert und der Überstand in desionisiertem Wasser zweimal 2 Stunden dialysiert. Nach weiterem Zentrifugieren (40.000 g, 15 min) folgten wieder 2 Stunden Dialyse bei 4° C in 0,1 m NaCl. Anschließend wurde das antigene Material durch Ultrafiltration in Minicon-Filtern auf eine Proteinkonzentration von etwa 4 g % eingeengt.

Immunisierung von Mäusen gegen den Tumor: Die Immunisierung von Mäusen erfolgte mit MC3-Zellen, die, wie oben

*) V.a. bei Tumoren mit starker immunogener Wirkung dürfte der Anteil der Tumorantigene am 3 m KCl-Extrakt relativ hoch sein; der Tumor MC3 (siehe oben) wurde unter diesem Gesichtspunkt für die vorliegende Studie ausgewählt.

beschrieben, erhalten wurden, dann jedoch bei 57° C 30 min inaktiviert und bei -70° C eingefroren wurden.

Injiziert wurden jeweils 1×10^6 derart behandelte Zellen, und zwar zunächst drei Wochen lang 2-mal pro Woche, beim ersten Mal zusammen mit komplettem Freund'schem Adjuvans (FA) in die Pfoten, dann immer abwechselnd ohne FA i.p. und mit FA i.m.. Nach den ersten 3 Wochen wurde 1 Woche Pause eingelegt; dann nochmals 2-mal ohne FA i.p. und 1-mal mit FA i.m. (abwechselnd).

Nach einer weiteren Woche Pause wurde dann bei der entsprechenden Versuchsgruppe von Mäusen der Tumor überpflanzt.

Diese besondere Immunisierungsprozedur wurde gewählt, da sie zu einer signifikanten Verlangsamung des Tumorzustands bzw. in einem Teil der Fälle sogar zu einer Abstoßung des Transplantates führt.

Zur Kontrolle wurde eine Gruppe von Mäusen in entsprechender Weise nur mit FA behandelt.

Anti-Tumor-Seren: Zur Gewinnung von syngenischen Antisera gegen Tumorantigene wurden Mäuse nach der gleichen Prozedur wie oben gegen MC3-Zellen immunisiert. 8 Wochen nach Beginn der Immunisierung wurde den Mäusen in Äthernästhesie durch retroorbitale Punktion Blut entnommen, gesammelt und nach 2 h Gerinnung bei 20° C zur Serumgewinnung abzentrifugiert (1700 g, 15 min, 4° C). Diese Antisera wurden, eingefroren bei -70° C, aufbewahrt und nach dem Auftauen hochtourig abzentrifugiert.

Im Versuch wurden nur solche Antisera verwendet, die

1. selbst keine oder fast keine Immunkomplexe enthielten, welche den Antigennachweis im Raji-Zell-Test hätten stören können; und die

2. mit Normalseren inkubiert keine oder nur ganz schwache Immunfluoreszenz im Raji-Test ergaben; und die
3. mit 3 m KCl-Tumorextrakten unter Zugabe von Normalserum als Komplementquelle mäßig positive (= ++) oder stark positive (= +++) Resultate im Raji-Test erzielten.

Im Agglutinationstest nach Avrameas (siehe unten S. 21) erreichten diese Antitumorseren Antikörpertiter von 1:128 (siehe Tabelle 5, S. 28).

Gewinnung der Seren der Versuchstiere: Die Mäuse wurden äther-anästhesiert und dann retroorbital punktiert. So wurden 0,3 bis 0,8 ml Blut je Maus einzeln gewonnen. Das Blut konnte 2 Stunden bei Raumtemperatur gerinnen und wurde dann bei 4⁰ C und 1400 g 15 min lang zentrifugiert. Die Seren wurden abgehebert (weiter je Versuchstier einzeln gehalten) und dann sofort dem Test unterzogen.

Untersuchungen der Seren im Raji-Zell-Test: Zur Untersuchung auf zirkulierende Immunkomplexe wurden die Seren ohne weitere Vorbehandlung getestet.

Zum Nachweis freier Tumor-Antigene im Serum bzw. freier (IgG) Antikörper gegen Tumor-Antigene wurden je 50 µl der Probe mit 20 µl Tumorantisera bzw. mit Tumorantigenen (= 10 µl KCl-Extrakten von MC3-Tumoren) 30 min bei 37⁰ C vorinkubiert und dann getestet.

Seren von tumortragenden, vorimmunisierten Mäusen wurden nur auf zirkulierende Immunkomplexe geprüft.

Wo bei den Ergebnissen gesondert aufgeführt, wurden Seren auch dem Raji-Test auf IgM-haltige Komplexe unterzogen.

Nachweis von Antikörpern gegen Tumor-Antigene: Zusätzlich zur Untersuchung im Raji-Zell-Test wurden Antikörper gegen Tumor-Antigene auch mit einer Agglutinationsmethode, modifiziert nach Avrameas et al ⁵⁾, nachgewiesen.

Im Prinzip beruht dieser Test darauf, daß Hammelerythrozyten (= HE) mit Antigen (in diesem Falle mit 3 m KCl-Extrakt aus dem MCAF) beladen und dann als Indikatorsystem zu Serumproben gegeben werden. Wenn nun diese Seren, die vorher mit normalen HE immunabsorbiert werden müssen, die antigengekoppelten HE agglutinieren können, so kann man daraus auf die Anwesenheit von Antikörpern gegen das betreffende Antigen schließen; weiter kann man durch Verdünnungsreihen Antikörpertiter bestimmen.

Im Einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen:

- a) Koppelung des Antigens an die HE: 50 µl des 3 m KCl-Extrakts, also etwa 2 mg antigenen Proteins wurden in 10 ml 0,2 m Phosphatpuffer pH 7,2 verdünnt. Dazu wurden 0,4 ml der gewaschenen und sedimentierten HE und 2 ml einer 2,5 %-igen Glutaraldehydlösung unter leichtem Rühren zugegeben. Nach einer Stunde unter starkem Schütteln bei 20° C wurden die nun antigenbeladenen HE dreimal in Phosphatpuffer gewaschen und dann in 5 ml PBS mit 1 % Kaninchen-serum resuspendiert.
- b) Hämagglutinationstest: Die zu testenden Seren wurden 30 min bei 56° C inaktiviert und pro ml mit 2 Tropfen HE-Suspension 10 % (normale HE!) immunabsorbiert, um eventuelle Antikörper gegen HE zu entfernen. Auf Mikro-hämagglutinationsplatten wurden in PBS mit 1 % Kaninchen-serum geometrische Verdünnungsreihen der Seren angelegt,

beginnend mit 1:1, 1:2 usw. (Volumen je Vertiefung: 50 μ l). Dann wurden zu jeder Verdünnungsstufe 20 μ l der antigengekoppelten HE zugegeben, leicht geschüttelt und nach 12 Stunden bei 4⁰ C ausgewertet. Als Titer wurde die höchste Verdünnung bezeichnet, bei der noch eine Agglutination auftrat.

Versuchsanordnung: Untersucht wurden die Seren je einer Gruppe von 15 sensibilisierten und 15 nicht sensibilisierten tumortragenden Mäusen, und zwar am 1., 7., 14., 21. und 28. Tag nach der Tumorüberpflanzung. Getestet wurden jeweils einzeln die Seren von 3 Mäusen jeder Gruppe, wobei diese Mäuse markiert wurden.

Untersucht wurde mit dem Raji-Zell-Test auf Gehalt an löslichen Immunkomplexen sowie an freiem Tumor-Antigen bzw. Antikörpern gegen den Tumor im Serum.

Als Kontrollen dienten ebensoviele Gruppen von

- sensibilisierten aber nicht tumortragenden Mäusen
- nicht sensibilisierten und nicht tumortragenden Mäusen (= Normalmäuse)
- nur mit FA behandelten (siehe oben) nicht tumortragenden Mäusen
- nicht sensibilisierten Mäusen mit einem subkutanen Transplantat von 10⁶ syngen normalen Fibrozyten.

Zusätzlich wurden die Seren von tumortragenden Mäusen am 7., 14., 21. und 28. Tag nach der Tumortransplantation mit der Hämagglutinationsmethode auf zirkulierende Antikörper gegen Tumorantigene untersucht.

IgM-haltige Komplexe wurden mit der entsprechenden Modifikation des Raji-Tests im Serum tumortragender Mäuse am 1., 7., 14., 21. und 28. Tag nach Transplantation gesucht.

Ergebnisse

Die Seren von MCAF-tragenden aber nicht vorsensibilisierten Mäusen zeigten im Raji-Test ab dem 7. Tag nach Tumortransplantation bis zum 28. Tag einen geringen Gehalt an zirkulierenden IgM-haltigen Immunkomplexen (Fluoreszenz sehr schwach positiv (= +); vgl. Tab. 4, S. 27). Dagegen waren in den Seren dieser Tiere während des ganzen Beobachtungszeitraumes keine IgG-haltigen Immunkomplexe zu finden.

Weder im Raji-Test noch im Agglutinationstest konnten bei den nichtimmunisierten Mäusen während der Tumorerkrankung zirkulierende freie Antikörper gegen Tumorzellantigene nachgewiesen werden (Tab. 5, S. 28).

Zirkulierendes freies Antigen von Tumorzellen, nachgewiesen mit Antitumorseren im Raji-Test, war bei diesen Tieren schon am 1. Tag nach Tumortransplantation stark positiv (= +++) vorhanden; es verschwand nahezu bis zum 7. Tag nahezu aus den Seren und wurde dann bis zum 28. Tag ansteigend wieder nachgewiesen (Abb. 2, S. 24).

Kontrolltiere, die nur normale syngene Fibroblasten anstelle der MCAF-Zellen erhalten hatten, zeigten ebenfalls während der ganzen Zeit keine zirkulierenden IgG-haltigen Immunkomplexe. Der Raji-Test mit Antitumorseren, sonst zum Nachweis freien Tumorzellantigens verwendet, war bei diesen Mäusen am 1. Tag nach Tumortransplantation schwach positiv (= +), in einigen Fällen sogar mäßig positiv (= ++), aber ab dem 7. Tag für den Rest des Beobachtungszeitraumes völlig negativ (Abb. 2, S. 24). Alle Kontrollen mit nicht sensibilisierten, nicht tumortragenden Tieren, also mit "normalen" Mäusen, waren negativ.

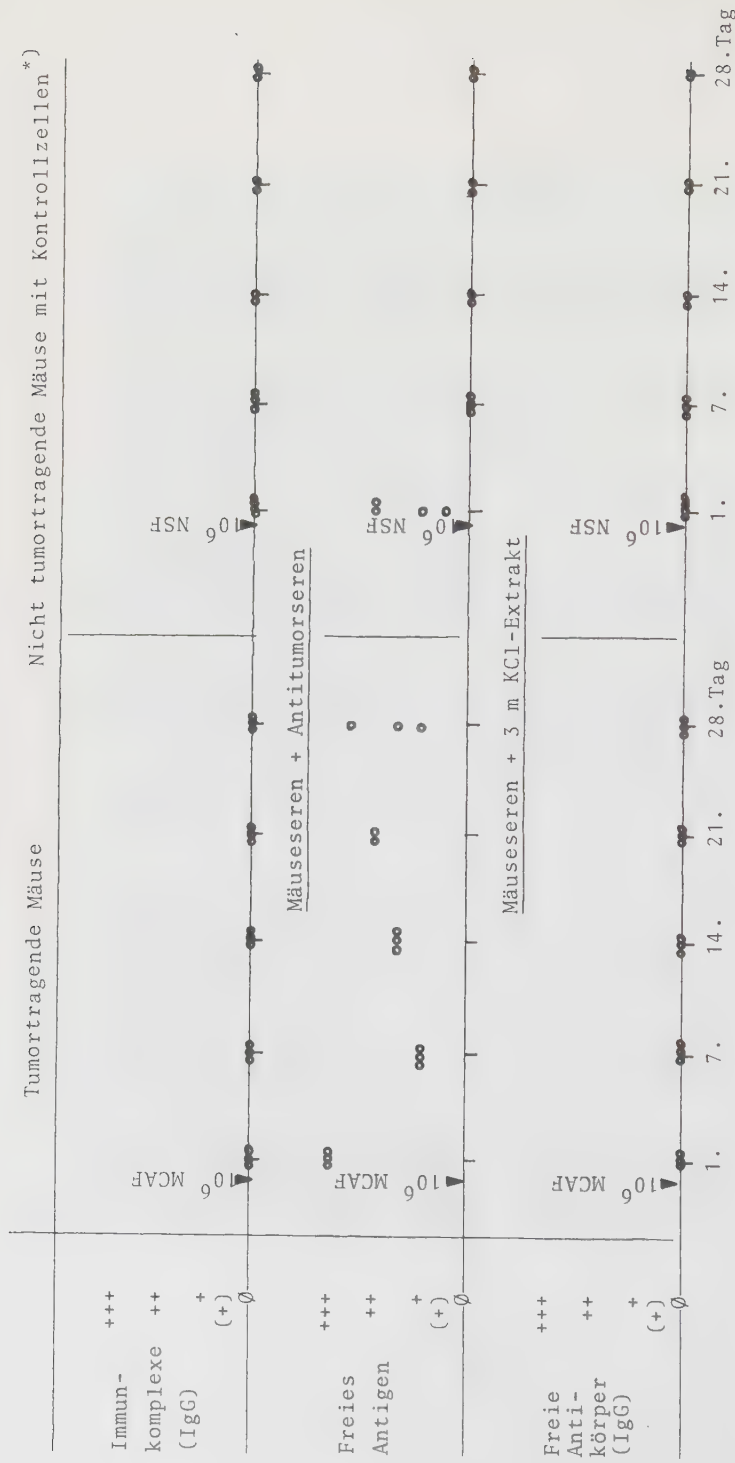


Abb. 2: Demonstration von Immunkomplexen, freiem Antigen und Antikörpern in Seren von normalen C57-B1-Mäusen nach Transplantation eines syngenischen methylcholanthren-induzierten Fibrosarkoms (= MCAF). NSF = Normale, syngene Fibroblasten.

*) Alle Kontrollen mit nicht tumortragenden Normalmäusen ohne Kontrollzellen waren negativ.

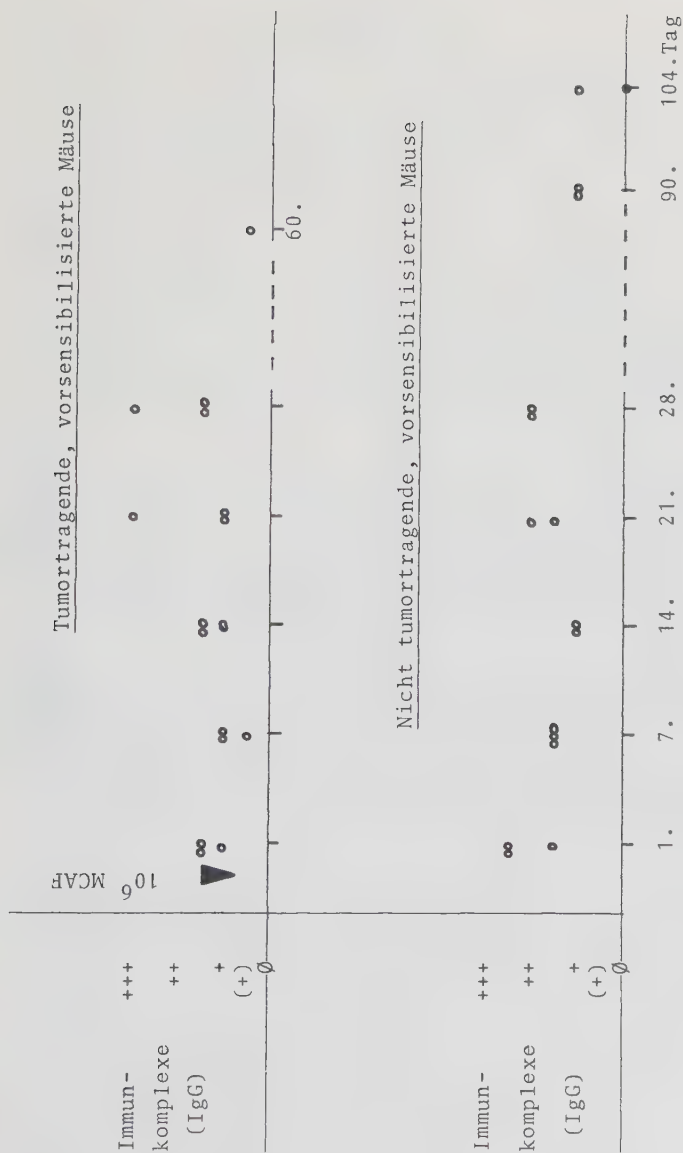


Abb. 3: Demonstration von zirkulierenden Immunkomplexen in den Seren von vorimmunisierten Mäusen nach Transplantation von MCAF.

In der Gruppe der vorsensibilisierten Mäuse, denen ein MCAF transplantiert wurde, war der Raji-Test auf zirkulierende IgG-haltige Immunkomplexe vom 1. bis zum 28. Tag in allen Fällen von + bis +++ positiv (Abb. 3, S. 25). Das Serum eines Versuchstieres, das den Tumor zunächst abgestoßen hatte, das aber nach 60 Tagen ein großes, nekrotisierendes MCAF entwickelt hatte, ergab im Raji-Test immer noch einen deutlichen, wenn auch nur sehr schwach positiven Nachweis von zirkulierenden IgG-Immunkomplexen. In Bezug auf den Immunkomplexgehalt im Serum konnten aber keine Unterschiede zwischen Versuchstieren mit stark verzögertem Tumorstadium bzw. Abstoßung des Transplantats und Tieren mit schnellerem Tumorstadium beobachtet werden.

Die Kontrollgruppe von sensibilisierten Mäusen ohne MCAF hatte während der ganzen Beobachtungsperiode zirkulierende IgG-haltige Immunkomplexe im Serum. Ferner enthielten Seren dieser Mäuse vom 7. und 21. Tag nach Ende der Immunisierungsprozedur IgM-haltige Immunkomplexe (Raji-Test schwach bis mäßig positiv = + bis ++; siehe Tabelle 4, S. 27).

Die Kontrollgruppe, die anstelle der Sensibilisierung gegen MC3 nur mit komplettem Freund'schen Adjuvans behandelt worden war und kein Tumortransplantat erhielt, ergab im Raji-Test völlig negative Ergebnisse für Immunkomplexe, Tumorantigene und Tumorantikörper.

Tabelle 4

Nachweis von Immunkomplexen im Serum nach Immunisierung
bzw. Transplantation von MCAF.

Serum von	Zeitpunkt	Ergebnis des Raji-Testes auf IgM-Komplexe	Ergebnis des Raji- Testes auf IgG-Komplexe
Tumor- tragende nicht immuni- sierte Mäuse	1.Tag *)	Ø	Ø
	7.	(+)	Ø
	14.	(+)	Ø
	21.	(+)	Ø
	28.	(+)	Ø
Nicht tumor- tragende immuni- sierte Mäuse	7.Tag **)	++	++ bis +++
	21.	+	+

*) Nach Tumortransplantation.

**) Nach der letzten Injektion hitzeabgetöteter MCAF-Zellen.

Tabelle 5

Nachweis von zirkulierenden freien Antikörpern (Ak) gegen Antigene von MCAF-Zellen im Agglutinationstest nach Avrameas ⁵⁾ und im Raji-Zell-Test.

Seren von	Tag nach Transplantation lebender MCAF-Zellen	Ak-Titer im Agglutinationstest	IgG-Nachweis im Raji-Test unter Zusatz von 3 m KCl-Extrakt aus MC3
Tumortragende nicht immunisierte Mäuse	1.	-	Ø
	7.	Ø	Ø
	14.	Ø	Ø
	21.	Ø	Ø
	28.	Ø	Ø
Nicht tumortragende immunisierte Mäuse ^{*)}	Tag nach Ende der Immunisierung		
	21.	1:128	+++

- = nicht durchgeführt

*) Antitumorseren; siehe Seite 19.

DISKUSSION

=====

Unsere Untersuchungen zeigen, daß bei Mäusen mit wachsenden Methylcholanthren-induzierten Fibrosarkomen (MCAF) Antigen im Serum dauernd vorhanden ist. Insbesondere konnten schon am 1. Tag nach Tumortransplantation hohe Konzentrationen löslichen Antigens, das mit unseren Antiseren gegen MCAF reagiert, im Serum nachgewiesen werden. Der Befund steht in Übereinstimmung mit den Angaben in der Literatur, daß unmittelbar nach der Überpflanzung von Tumorzellen eine Antigeneinschwemmung in die Zirkulation, wahrscheinlich durch Tumorzellyse infolge nichtimmunologischer Mechanismen erfolgt ⁶⁾.

Die Menge an Tumorantigenen in der Zirkulation sinkt am 7. Tag nach Überpflanzung auf ein Minimum ab, wobei davon ausgegangen werden kann, daß zu diesem Zeitpunkt die Menge lebender Tumorzellen im Wirtsorganismus gering ist und ausgeschüttetes Tumorantigen durch die einsetzenden Immunmechanismen zum Teil in regionalen Lymphknoten zurückgehalten wird.

Jenseits des 14. Tages nach Tumortransplantation tritt erneut Antigen in der Zirkulation in steigenden Konzentrationen auf. Diese Antigenausschwemmung korreliert mit der zunehmenden Tumorgröße, wobei morphologische Untersuchungen zu diesem Zeitpunkt zentrale Nekrosen und Einbruch des Tumors in das umgebende Gewebe zeigen. Dieses Ergebnis steht wiederum in Übereinstimmung mit den Angaben der Literatur. Thomson ⁷⁾ kommt aufgrund von Untersuchungen an MCA-induzierten Sarkomen der Ratte zu der Feststellung, daß

in einem ersten Stadium unmittelbar nach Transplantation des Tumors hohe lokale Konzentrationen von löslichem Tumorantigen vorhanden sind, das auch in die Zirkulation ausgeschwemmt wird.

In einer mittleren Periode, in der das Wirtstier hohe immunologische Reaktivität, gekennzeichnet durch concomitant immunity ^{*)}, gegenüber dem Tumor entwickelt, findet sich eine rasche Tumorzellproliferation bei noch absolut niedrigen Tumorzellzahlen. In dieser Periode ist die Antigenkonzentration in der Zirkulation niedrig.

Im Spätstadium der Tumorerkrankung schwemmt der inzwischen umfangreiche Tumor Antigene in großen Mengen in das Serum aus, wodurch eine Paralyse der Immunreaktion gegenüber dem Tumor bewirkt werden kann.

Bei der quantitativen Bestimmung des Antigens fand Thomson bei MCA-Sarkom-tragenden Ratten Antigenkonzentrationen zwischen 10 und 40 ng/ml Serum. Aufgrund unserer Untersuchungen muß eine wesentlich höhere Antigenkonzentration im Serum MCAF-tragender Mäuse angenommen werden, da die maximale Empfindlichkeit des Antigennachweises bei der von uns angewendeten Rajizelltechnik in der Größenordnung von 10 ug/ml Serum liegt. Dabei wird davon ausgegangen, daß die Empfindlichkeitsgrenze für das MCAF-Zell-Antigen-Antikörper-System im gleichen Bereich liegt, wie er für das Human Ig-Mäuse-Anti Ig-System gemessen wurde.

Über die Art des Antigens, das mit unseren Antiseren nach-

*) concomitant immunity ist die Fähigkeit eines Wirtstieres, während des Wachstums eines Tumortransplantates ein an anderer Stelle gegebenes Transplantat des gleichen Tumors abzustößen. Ein Maß für die Stärke der concomitant immunity ist die maximale Tumorzelldosis, die noch abgestoßen wird.

gewiesen wird, kann aufgrund der vorliegenden Untersuchungen keine Aussage gemacht werden. In der Literatur werden tumorspezifische Transplantationsantigene (TSTA), die zu spezifischen Immunreaktionen gegenüber den das Antigen tragenden Tumorzellen führen, von tumorassoziierten Antigenen unterschieden, die bei Tumorzellen vermehrt vorkommen, aber auch an anderen Zellen des Organismus nachgewiesen werden können. Von diesen sind die embryonalen Antigene am besten definiert. Bei den MCA-induzierten Sarkomen sind beide Typen von Antigenen beschrieben worden ^{8-11), 6)}; ebenso bei anderen chemisch induzierten Tumoren ¹⁰⁻¹³⁾.

Für die Abstoßung von MCAF sind nach dem Ergebnis der meisten Studien individuelle TSTA verantwortlich, während in vitro-Techniken zum Nachweis humoraler oder zellulärer Immunreaktionen bei MCAF-tragenden Tieren in der Regel Kreuzreaktionen u.a. auch mit Antigenen fetaler Zellen zeigen ^{14), 15)}. Es wurde deshalb vermutet, daß die in vitro-Techniken auch Immunreaktionen gegen fetale Antigene entdecken, die nicht zur Abstoßung von Tumortransplantaten führen ¹³⁾.

Bemerkenswerterweise wurde in unseren Kontrollversuchen, bei denen normale Fibroblasten anstelle von MCAF-Zellen übertragen wurden, unmittelbar nach Überpflanzung freizirkulierendes Antigen, wenn auch in geringer Menge, durch unsere Antiseren mit dem Raji-Zell-Test entdeckt. Dieser Befund weist darauf hin, daß unsere Antiseren u.a. auch mit Antigenen reagieren, die von Körperzellen freigesetzt werden. Es muß offen bleiben, ob die Antiseren neben diesen kreuzreagierenden Antigenen noch andere Antigene entdecken, die nur auf MCAF-Zellen vorkommen.

In unseren Versuchen wurden in den Seren nichtimmunisierter tumortragender Tiere freie Antikörper gegen Antigene der

MCAF-Zellen zu keinem Zeitpunkt der Tumorentwicklung gefunden. Die Ergebnisse waren sowohl mit der Rajizelltechnik als auch mit der Agglutinationsmethode negativ. Dies steht in Übereinstimmung mit Angaben in der Literatur. Thomson et al.¹⁶⁾ konnten bei MCAF-tragenden Ratten keinen meßbaren Antikörpertiter gegen TSTA im Serum nachweisen, während in der Lymphe niedrige Antikörpertiter vorhanden waren. Zirkulierende freie Antikörper traten erst nach Exzision des Tumors im Serum auf. Ähnliche Ergebnisse wurden in anderen Studien beschrieben^{20), 7), 25)}.

Demgegenüber konnten Price und Baldwin¹⁷⁾ im fortgeschrittenen Stadium der Tumorerkrankung nach intraperitonealer Implantation eines chemisch induzierten Rattenhepatoms zirkulierende IgG-Antikörper und cytotoxische Antikörper im 19 S-Bereich des fraktionierten Serums (IgM-Antikörper oder Immunkomplexe bei Antikörperüberschuß) nachweisen, die spezifisch mit Antigenen der Tumorzellen reagierten. In der gleichen Studie wurden allerdings bei subkutaner Tumortransplantation keine zirkulierenden Antikörper gefunden. Pollack et al.¹⁸⁾ fanden bei Mäusen mit subkutanen Transplantaten von MCAF zirkulierende Antikörper, die eine antiserumabhängige Lymphozytotoxizität gegen Tumorzellen hervorrufen konnten. Diese Antikörper mögen jedoch auch in Immunkomplexen im Serum vorgelegen haben.

Für das von uns beobachtete Fehlen von freien Antikörpern gegen Tumorzellantigene im peripheren Blut kommen u.a. folgende Gründe in Frage: Die vom Wirtstier gebildeten Antikörper können vom soliden Tumor abgefangen werden. Ferner können Antikörper mit Antigen reagieren und in der Zirkulation in Form von Immunkomplexen vorliegen oder in regionalen Lymphknoten abgefangen werden. Schließlich kann etwa infolge von Suppressormechanismen oder infolge mangeln-

der Immunogenität eine humorale Immunreaktion ausbleiben. Aufgrund unserer Ergebnisse können wir darüber jedoch keine Aussage machen.

Zirkulierende Immunkomplexe werden in der Literatur in zahlreichen Tumorsystemen in den Seren unbehandelter tumortragender Tiere beschrieben. So hatten Sjögren et al.¹⁹⁾ bei Mäusen mit wachsenden MCA-induzierten Sarkomen auf zirkulierende Antigen-Antikörperkomplexe hingewiesen. Thomson²⁰⁾ fand zirkulierende Immunkomplexe bei Ratten mit intramuskulär wachsenden Transplantaten von MCA-Sarkomen. Ebenso konnte Baldwin²¹⁾ bei intraperitonealem Wachstum eines Amino-Azo-Farbstoff-induzierten Hepatoms der Ratte Immunkomplexe im Serum nachweisen. Bowen²²⁾ fand bei subkutaner Transplantation des gleichen Tumors im Spätstadium der Tumorerkrankung Immunkomplexe im Antikörperüberschuß.

In unseren Untersuchungen waren IgM-haltige Immunkomplexe im Serum tumortragender nichtimmunisierter Tiere ab dem 7. Tage nach Tumorübertragung in niedrigen Konzentrationen vorhanden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß jenseits des 7. Tages eine Antikörperbildung der IgM-Klasse ingangkommt, wobei mit ausgeschüttetem Antigen der MCAF-Zellen Immunkomplexe gebildet werden.

Demgegenüber waren IgG-haltige Immunkomplexe zu keinem Zeitpunkt nach Transplantation der MCAF nachzuweisen. Das könnte darauf zurückzuführen sein, daß IgG-Immunkomplexe im hohen Antigenüberschuß vorlagen und deshalb mit der Rajizelltechnik nicht entdeckt werden konnten, worauf Theofilopoulos²⁾ hingewiesen hat. Möglicherweise wurden aber auch keine Antikörper der IgG-Klasse gegen Tumorzellantigene gebildet.

Auf jeden Fall läßt sich unsere Beobachtung hoher Antigenkonzentrationen im Serum bei progressivem Tumorwachstum mit

der weithin in der Literatur vertretenen Ansicht vereinbaren, daß vom Tumor ausgeschüttetes Antigen frei oder in Immunkomplexen die zellbedingte Immunreaktion inhibieren und somit eine Ursache des Versagens des Immunsystems bei der Tumorabwehr darstellen kann ^{10), 23), 26)}.

Bei immunisierten Tieren wurden Immunkomplexe bereits vor Übertragung von lebenden Tumorzellen nachgewiesen; sie konnten bis zu drei Monaten nach der letzten Injektion von hitzeabgetöteten Zellen beobachtet werden. Das Ergebnis zeigt, daß antigenes Material, das in diesem Falle von den hitzeinaktivierten Zellen stammt, über lange Zeit in der Zirkulation persistiert und mit den vom Wirtstier gebildeten Antikörpern zirkulierende Immunkomplexe bildet.

Immunkomplexe fanden sich bei den immunisierten Tieren auch ständig während des ganzen Beobachtungszeitraumes nach Übertragung lebender Tumorzellen. Auf einen Rückgang der Antikörperbildung im Verlauf der Tumorerkrankung kann daher nicht geschlossen werden.

Thomson ¹⁶⁾ beobachtete bei immunisierten Ratten nach Überpflanzung eines MCA-induzierten Sarkoms einen Rückgang der Antikörperaktivität im Serum; er führte dies aber, auch im Zusammenhang mit anderen Versuchen ^{21), 20)}, auf die Bildung von Immunkomplexen mit vom Tumor ausgeschüttetem Antigen zurück. Auch mögen Unterschiede in der Immunisierungsprozedur für eine unterschiedliche Kinetik der Antikörperproduktion verantwortlich sein.

Von Versuchen, in denen lebende Tumorzellen überpflanzt wurden, wissen wir, daß die bei uns beobachteten zirkulierenden Immunkomplexe das Tumorstadium nicht im Sinne des enhancement fördern, sondern bei den immunisierten Tieren in einem Drittel bis einem Viertel der Fälle es zur Regression

der Tumoren und in den restlichen Fällen zu einer deutlichen Verlangsamung des Tumorwachstums kommt. In Bezug auf den Immunkomplexgehalt des Serums konnten wir keinen Unterschied zwischen Regressor- und Progressortieren beobachten. Damit wird deutlich, daß in vivo Relevanz zirkulierender Immunkomplexe schwer voraussehbar ist.

Sjögren, Hellström et al. ¹⁹⁾ hatten Antigen-Antikörper-Komplexe für die Blockierung der zellbedingten Immunreaktion gegenüber dem Tumor verantwortlich gemacht. In gleicher Richtung zeigten auch Baldwin ²²⁾, 24-26), Thomson ⁷⁾ die Bedeutung zirkulierender Antigene bzw. Antigen-Antikörper-Komplexe für die Inhibition der zellbedingten Immunreaktion und die Immunität gegen den Tumor in vivo. Übereinstimmend werden in der Literatur zirkulierendes Antigen und Immunkomplexe als eine Ursache beschleunigten Tumorwachstums angesehen ²⁸⁻³⁰⁾, ¹⁾. In unseren Versuchen zeigt sich, daß Immunkomplexe in der Zirkulation durchaus mit einer Regression des Tumors vereinbar sein können. Von den Untersuchungen von Baldwin ist ersichtlich, daß eine inhibierende Wirkung auf die zellbedingte Immunität offensichtlich insbesondere von freiem Antigen bzw. von Immunkomplexen im Antigenüberschuß ausgeht ¹⁰⁾.

Neben diesen quantitativen Aspekten sind vor allem aber auch qualitative Unterschiede der Immunkomplexe zu berücksichtigen. Eine wirksame Inhibition der T-Zell-abhängigen Immunreaktion, die zur Abstoßung eines Tumors, hier von MCAF, führt, ist nur dann zu erwarten, wenn das für die Immunreaktion verantwortliche Antigen Bestandteil des Immunkomplexes ist. Dies bedeutet, daß die Analyse von Immunkomplexen bei tumortragenden Tieren nur dann für das Tumorwachstum wichtige Rückschlüsse erwarten läßt, wenn es gelingt, das für die Abstoßung verantwortliche Antigen zu isolieren und es in den Immunkomplexen zu identifizieren.

Z U S A M M E N F A S S U N G

=====

Untersucht wurden die Seren von Mäusen mit wachsenden Methylcholanthren-induzierten Fibrosarkomen (MCAF) auf ihren Gehalt an Immunkomplexen, löslichem Tumorantigen und Antikörpern. Weiterhin wurden Mäuse, die vor der Überpflanzung lebender Tumorzellen durch i.m. und i.p. Injektionen von hitzeabgetöteten MCAF-Zellen immunisiert worden waren, auf zirkulierende Immunkomplexe getestet.

Als Nachweismethode diente der Raji-Zell-Test nach Theofilopoulos ²⁾, der darauf beruht, daß C3-haltige Immunkomplexe in Mäuseseren an C3-Rezeptoren von Raji-Zellen, einer etablierten menschlichen Lymphoblastenreihe, gebunden und mit Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden. In Vorversuchen wurde gezeigt, daß mit der Rajizelltechnik auch freie Antigene bzw. Antikörper durch Immunkomplexbildung in vitro nachgewiesen werden können, indem man die Seren zuerst mit entsprechenden Antiseren bzw. Antigenen inkubiert.

Die Versuche ergaben bei den nicht immunisierten Mäusen, die nach 30 - 40 Tagen an wachsenden MCAF starben, zu keinem Zeitpunkt der Tumorerkrankung IgG-haltige Immunkomplexe oder freie Antikörperaktivität im Serum. Dagegen gelang ab dem 7. Tag nach Tumorzelltransplantation ein schwach positiver Nachweis von IgM-haltigen Immunkomplexen. Ferner war während des ganzen Beobachtungszeitraums von 28 Tagen freies Antigen im Serum nachzuweisen.

Bei den immunisierten Tieren kam es nach Transplantation von 10^6 lebenden Tumorzellen in einem Drittel bis einem

Viertel der Fälle zur Regression der Tumoren; die restlichen Mäuse zeigten ein deutlich retardiertes Tumorstadium im Vergleich zu nicht vorbehandelten Tieren. Die Sera der immunisierten Mäuse enthielten vor und nach der Tumortransplantation bis zum Ende des Beobachtungszeitraums IgG-haltige Immunkomplexe in hoher Konzentration.

Unsere Befunde zeigen, daß der Nachweis von zirkulierenden Immunkomplexen nicht unbedingt mit einer Beschleunigung des Tumorstadiums (enhancement) korreliert sein muß. Es muß dabei in Betracht gezogen werden, daß die Analyse von Immunkomplexen nur dann für das Tumorstadium wichtige Rückschlüsse erwarten läßt, wenn es gelingt, das für die Abstoßung verantwortliche Antigen zu isolieren und es in den Immunkomplexen zu identifizieren.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

=====

- 1) R.W. Baldwin, R.A. Robins, 1975.
Humoral factors abrogating cell-mediated immunity in the tumor-bearing host.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 72, 21.
- 2) A.N. Theofilopoulos, C.B. Wilson, V.A. Bokisch, F.J. Dixon, 1974.
Binding of soluble immune complexes to human lymphoblastoid cells. II. use of Raji cells to detect circulating immune complexes in animal and human sera.
J. Exp. Med. 140, 1230.
- 3) C. Bianco, R. Patrick, V. Nussenzweig, 1970.
A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody-complement complexes.
J. Exp. Med. 132, 702.
- 4) M.S. Meltzer, 1971.
Tumor-specific antigen solubilized by hypertonic potassium chloride.
J. Natl. Cancer Inst. 47, 703.
- 5) Avrameas, Taudou, Chuilon, 1969.
Glutaraldehyd as coupling reagent in the passive hemagglutination test.
Immunochemistry 6, 67.
- 6) D.M.P. Thomson, V. Sellens, S. Eccles, P. Alexander, 1973.
Radioimmunoassay of tumourspecific transplantation antigen of a chemically induced rat sarcoma: circulating soluble tumour antigen in tumour bearers.
Br. J. Cancer 28, 377.
- 7) D.M. Thomson, 1975.
Soluble tumour-specific antigen and its relationship to tumour growth.
Int. J. Cancer 15, 1016.
- 8) D.M.P. Thomson, P. Alexander, 1973.
A cross-reacting embryonic antigen in the membrane of rat sarcoma cells which is immunogenic in the syngeneic host.
Br. J. Cancer 27, 35.

- 9) M. Zöller, M.R. Price, R.W. Balwin, 1976.
Inhibition of cell-mediated cytotoxicity to chemically induced rat tumours by soluble tumour and embryo cell extracts.
Int. J. Cancer 17, 129.
- 10) R.W. Balwin, M.J. Embleton, M.R. Price, A. Robins, 1974.
Immunity in the tumour-bearing host and its modification by serum factors.
Cancer 34, 1452.
- 11) R.W. Baldwin, D. Glaves, B.M. Vose, 1972.
Embryonic antigen expression in chemically induced rat hepatomas and sarcomas.
Int. J. Cancer 10, 233.
- 12) S. Ménard, M.I. Colnaghi, G. Della Porta, 1973.
In vitro demonstration of tumor-specific common antigens and embryonal antigens in murine fibrosarcomas induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene.
Cancer Research 33, 478.
- 13) R.W. Baldwin, M.J. Embleton, 1974.
Neoantigens on spontaneous and carcinogen-induced rat tumours defined by in vitro lymphocytotoxicity assays.
Int. J. Cancer 13, 433.
- 14) J.T. Forbes, Y. Nakao, R.T. Smith, 1975.
Tumour-specific immunity to chemically induced tumours.
J. Exp. Med. 141, 1181.
- 15) G.D. Parker, S.A. Rosenberg, 1977.
Serologic identification of multiple tumor-associated antigens on murine sarcomas.
J. Natl. Cancer Inst. 58, 1303.
- 16) D.M.P. Thomson, S. Eccles, P. Alexander, 1973.
Antibodies and soluble tumour-specific antigens in blood and lymph of rats with chemically induced sarcomata.
Br. J. Cancer 28, 6.
- 17) M.R. Price, R.W. Baldwin, 1977.
Tumour-specific complement-dependent serum cytotoxicity against a chemically induced rat hepatoma.
Int. J. Cancer 20, 284.
- 18) S.B. Pollack, K. Nelson, 1975.
Evidence for two factors in sera of tumour-immunized mice which induce specific lymphoid cell-dependent cytotoxicity:
IgG₂ and a rapidly appearing factor not associated with IgG or IgM.
Int. J. Cancer 16, 339.

- 19) H.O. Sjögren, I. Hellström, S.C. Bansal, K.E. Hellström, 1971.
Suggestive evidence that the blocking antibodies of tumor bearing individuals may be antigen-antibody complexes.
Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.) 68, 1372.
- 20) D.M.P. Thomson, K. Steele, P. Alexander, 1973.
The presence of tumour-specific membrane antigen in the serum of rats with chemically induced sarcomata.
Br. J. Cancer 27, 27.
- 21) R.W. Balwin, J.G. Bowen, M.R. Price, 1973.
Detection of circulating hepatoma D23 antigen and immune complexes in tumour bearer serum.
Br. J. Cancer 28, 16.
- 22) J.G. Bowen, R.A. Robins, R.W. Baldwin, 1975.
Serum factors modifying cell mediated immunity to rat hepatoma D23 correlated with tumour growth.
Int. J. Cancer 15, 640.
- 23) G.J. Mizejewski, 1973.
Humoral responses in tumor immunity: review of experimental findings.
Amer. J. Med. Sci. 266, 359.
- 24) R.W. Baldwin, M.R. Price, R.A. Robins, 1973.
Inhibition of hepatoma-immune lymph-node cell cytotoxicity by tumour-bearer serum and solubilized hepatoma antigen.
Int. J. Cancer 11, 527.
- 25) R.W. Baldwin, M.J. Embleton, R.A. Robins, 1973.
Cellular and humoral immunity to rat hepatoma-specific antigens correlated with tumour status.
Int. J. Cancer 11, 1.
- 26) R.W. Baldwin, M.R. Price, R.A. Robins, 1972.
Blocking of lymphocyte mediated cytotoxicity for rat hepatoma cells by tumour-specific antigen-antibody-complexes.
Nature New Biol. 238, 185.
- 27) M.J. Embleton, 1976.
Influence of cell-free tumour-associated antigen preparations on the development of immunity to chemically induced rat tumours.
Int. J. Cancer 18, 622.
- 28) K.E. Hellström, I. Hellström, 1974.
Lymphocyte mediated cytotoxicity and blocking serum activity to tumor antigens.
Adv. Immunol. 18, 209.

- 29) K.E. Hellström, I. Hellström, 1976.
Cell-mediated immunity to mouse tumors: some recent findings.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 276, 176.
- 30) S.C. Bansal, B.R. Bansal, J.P. Boland, 1976.
Blocking and unblocking serum factors in neoplasia.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 75, 45.

L e b e n s l a u f

von
Erich Platzer

- 1950 Am 25. Juli geboren in Regensburg
Vater Erich Platzer, Fachkaufmann
Mutter Hedwig Platzer, Krankenschwester, kfm.
Angestellte
- 1956 Volksschule Regensburg-Reinhausen
- 1960 Albrecht-Altdorfer-Gymnasium Regensburg,
humanistisch
- 1969 Abitur ebendort
- 1969-70 Grundwehrdienst
- 1970 Studium der Mathematik und Physik, Uni Regensburg
- 1973 Diplomvorprüfung Mathematik (Nebenfach Physik)
Im Sommersemester Beginn des Medizinstudiums in
Erlangen
- 1974 Heirat mit Lydia Platzer, geb. Wendling, jetzt
Verw.-Angestellte Uni Erlangen
- 1975 Ärztliche Vorprüfung
- 1976 1. Ärztliche Prüfung
- 1978 2. Ärztliche Prüfung, Praktisches Jahr in Fürth
und Erlangen
- 1979 3. Ärztliche Prüfung im April/Mai

Copy - Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30

Tel. 09131 - 26197